



**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК**



**ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД**

**ИМ. И.Д. ПАПАНИНА РАН**



**РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**



**ДЕПАРТАМЕНТ ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ  
ЯРОСЛАВСКОЙ ОБЛАСТИ**

## **АНТРОПОГЕННОЕ ВЛИЯНИЕ НА ВОДНЫЕ ОРГАНИЗМЫ И ЭКОСИСТЕМЫ**

**МАТЕРИАЛЫ**

**V ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ПО ВОДНОЙ ЭКОТОКСИКОЛОГИИ,  
ПОСВЯЩЕННОЙ ПАМЯТИ Б.А. ФЛЕРОВА**

**И**

## **СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ**

**МАТЕРИАЛЫ**

**ШКОЛЫ-СЕМИНАРА ДЛЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ, АСПИРАНТОВ И СТУДЕНТОВ**

**Борок, 28 октября - 1 ноября 2014 г.**

**ТОМ 2**

ферментативной активности в донных отложениях, наблюдается в местах антропогенного загрязнения гидросистем [2]. За период наблюдений урбанизированных водоемов в мегаполисе доля химического разложения  $H_2O_2$  колебалась в среднем от 43 до 100%. Полученные данные могут быть важным параметром, отражающим функциональное состояние бактериобентоса, а также четким индикатором слабой интенсивности процесса деструкции органического вещества в донных отложениях исследуемых водных объектов.

Известно, что высокий уровень активности каталазы необходим для обезвреживания перекиси водорода до воды и молекулярного (неактивного) кислорода. Также, разрушения перекиси водорода в донных отложениях водоемов протекает вследствие химических (неферментативных) реакций при участии веществ восстановленной природы биогенного и антропогенного происхождения [2–4]. Низкий окислительно-восстановительный потенциал в донных отложениях в водных объектах регистрируют не только на глубине, а и в поверхностном слое даже при хорошем кислородном режиме в воде. При антропопрессии в донных отложениях возникают ниши, в которых могут протекать процессы метаногенеза, сульфатредукции, денитрификации, обуславливающие снижение окислительно-восстановительного потенциала [5]. Высокий процент химического распада перекиси водорода в водоемах, может быть обусловлен значительным содержанием в донных отложениях гумусовых веществ, которые, как известно, обладают восстановительными свойствами. Некоторые авторы отмечают ингибирование активности каталазы тяжелыми металлами, которые депонируются в донных отложениях [3].

Преобладание химического процесса разложения перекиси водорода над ферментативным в донных отложениях исследуемых урбанизированных водоемах мегаполиса может свидетельствовать о сдвиге в них редокс-потенциала в сторону восстановленных условий, а также присутствию недоокисленных соединений, тяжелых металлов, пестицидов, фенолов, катализирующих химический процесс распада перекиси водорода. С одной стороны, это может быть сигналом плохой экологической ситуации в водных объектах столицы. С другой, химическое расщепление перекиси водорода в этих водных объектах может играть положительную роль в процессах ее улучшения и жизнедеятельности гидробионтов.

#### Список литературы

1. Петерсон Н.В., Курыляк Е.К., Франчук Е.К. Определение активности каталазы почв // Микробиол. журн. – 1984. – Т. 46, № 2. – С. 85–87.
2. Oleynik G.N., Starosila Ye.V. Structure and functioning of bacterioplankton and bacteriobenthos in the water bodies with high content of inorganic nitrogen // Hydrobiological Journal. – 2010. – Vol. 46, N 6. – P. 26–36.
3. Олейник Г.Н., Белоконь В.Н., Кабакова Т.Н. Бактериобентос и содержание тяжелых металлов в донных отложениях Сасыкского водохранилища // Гидробиол. журн. – 1996. – Т. 32, № 6. – С. 21–31.
4. Максимова Э.А., Максимов В.Н., Колесницкая Г.Н., Максимов В.В., Щетинина Е.В. Микробиологическая индикация и оценка состояния донных отложений Южного Байкала // Микробиология. – 1995. – Т. 64, № 3. – С. 399–404.
5. Дзюбан А.Н. Оценка экологического состояния водохранилищ по критериям бактериобентоса // Гидробиол. журн. – 2004. – Т. 40, № 4. – С. 73–79.

УДК 546.49:582.232

#### ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РТУТИ НА ОДНОКЛЕТОЧНЫЕ ВОДОРОСЛИ

А.П. Стецюк, О.А. Рылькова, В.С. Муханов, С.Б. Гулин

*Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского  
г. Севастополь, Россия, alex-ra-777@mail.ru*

Тяжелые металлы относятся к особо опасным загрязнителям водной среды. Они поступают в водоемы с промышленными, сельскохозяйственными и бытовыми стоками. Опасность воздействия этих поллютантов связана с тем, что, циркулируя длительное время в гидросфере, они аккумулируются в гидробионтах, преимущественно в начальных звеньях трофических цепей. Ответные реакции одноклеточных водорослей на действие тяжелых металлов являются достаточно быстрыми, вследствие чего структурные характеристики фитопланктона могут служить репрезентативными показателями состояния водных экосистем [2, 3].

Цель работы – экспериментальное исследование биологического воздействия ртути на одноклеточные водоросли с помощью проточной цитометрии.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1 – изучение действия ртути на темпы деления и размерные характеристики пресноводных, морских и галофильных одноклеточных водорослей;

2 – определение и анализ зависимости «доза-эффект» в отношении токсического воздействия на структурные, биопродукционные и физиологические характеристики фитопланктона.

В работе использовали монокультуры водорослей *Chlorella vulgaris* Beijer., *Dunaliella salina* Teod., *Platymonas viridis* Rouch, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. Анализ проб проводили с помощью проточного цитометра Cytomics™ FC 500 (Beckman Coulter, США), оборудованного 488 нм однофазным аргоновым лазером, и программного обеспечения CXP (рис. 1).

Общую численность клеток микроводорослей определяли в неокрашенных пробах с помощью гейтинга популяции клеток на 2-параметрических цитограммах прямого светорассеивания (FS) и автофлуоресценции в красной области спектра (FL4, 675 нм) на безразмерных логарифмических шкалах. Концентрацию клеток микроводорослей рассчитывали по скорости потока пробы 60 мкл мин<sup>-1</sup>, времени счёта 360 сек. и количеству клеток, зарегистрированных в этот промежуток времени (минимум 3000 кл.). Контроль качества измерений проводили с помощью калибровочных флуоросфер Flow-Check™ (Beckman Coulter) с известной концентрацией в пробе. Калибровку цитометрических измерений размеров клеток по каналу FS проводили с помощью разноразмерных (0.2 – 10 мкм) флуоресцентных микросфер (Beckman Coulter, Molecular Probes, США). Размеры клеток (L, мкм) рассчитывали на основе данных канала FS как величину «диаметра эквивалентной сферы» (ДЭС), объём которой равен объёму клетки независимо от её морфологии. Обработку цитометрических данных проводили с помощью программного обеспечения Flowing Software v. 2.5.0 (Perttu Terho, Turku Centre for Biotechnology, University of Turku, Finland, [www.floowingsoftware.com](http://www.floowingsoftware.com)).

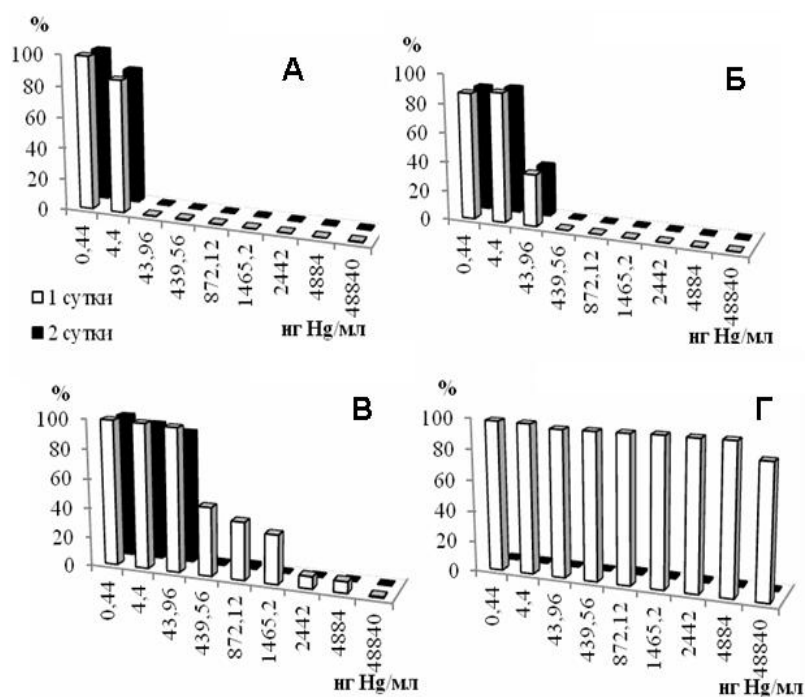
При проведении эксперимента из исходных культур отбирали по 10 мл аликвот, в которые вносили насыщенный раствор сулемы (HgCl<sub>2</sub>) разной концентрации. Цитометрические измерения (численность, размерный спектр и пигментный состав клеток) проводили через 30 мин. после начала экспозиции, а затем один раз в сутки.



**Рис. 1.** Проточный цитометр Cytomics FS 500, Beckman Coulter, США

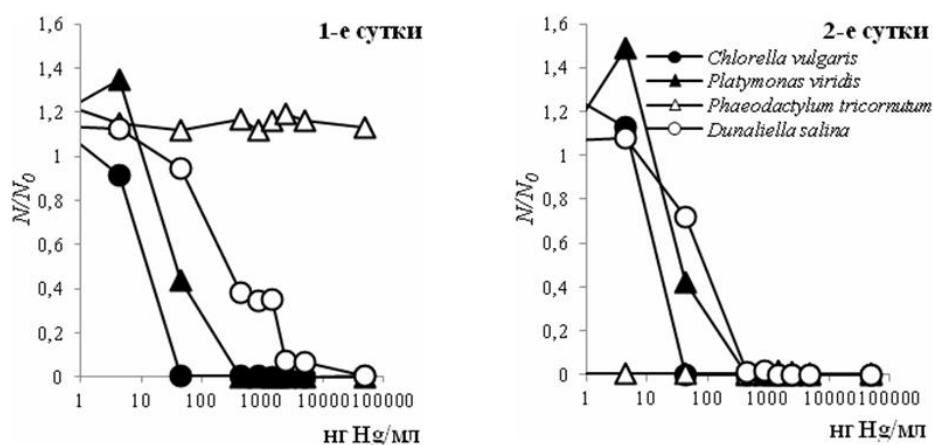
Часть проб была параллельно исследована с помощью инвертированного микроскопа (Nikon Eclipse TS 100-F увеличение 400х). По микрофотографиям с помощью программного обеспечения ImageJ были проведены линейные измерения клеток и рассчитан их объём.

Нами обнаружено, что доли живых клеток после воздействия токсиканта в культурах водорослей отличались. Для *Chlorella vulgaris* Beijer. и *Platymonas viridis* Rouch этот показатель резко снизился, начиная с концентрации 44.0 нг Hg·мл<sup>-1</sup>. Для *Dunaliella salina* Teod., подобная тенденция наблюдалась при воздействии концентрации на порядок выше (439.6 нг Hg·мл<sup>-1</sup>). Несколько отличалась картина, полученная для *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin – в течение первых суток во всех концентрациях количество живых клеток практически не изменилось, а сутки спустя - все клетки были нежизнеспособны (рис. 2).



**Рис. 2.** Доля живых клеток (%) в культурах водорослей при воздействии различной концентрации ртути. А - *Chlorella vulgaris* Beijer., Б - *Platymonas viridis* Rouch, В - *Dunaliella salina* Teod., Г - *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin.

В течение 1-х суток при минимальных концентрациях ртути (0.44 и 4.4 нг Нг·мл<sup>-1</sup>), численность водорослей либо не изменялась (*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, *Dunaliella salina* Teod.), либо несколько увеличивалась (*Platymonas viridis* Rouch), либо снижалась (*Chlorella vulgaris* Beijer.). При концентрации ртути 44.0 нг Нг·мл<sup>-1</sup> и более нами зафиксировано снижение плотности популяции водорослей для всех культур кроме *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. Необходимо отметить, что численность водорослей в последней культуре на 2-е сутки была практически равна нулю при любых концентрациях ртути. Для некоторых водорослей процесс адаптации к воздействию токсиканта выражался в повышении темпов деления клеток при небольших его концентрациях, а далее происходило угнетение темпов роста водорослей (рис. 3).

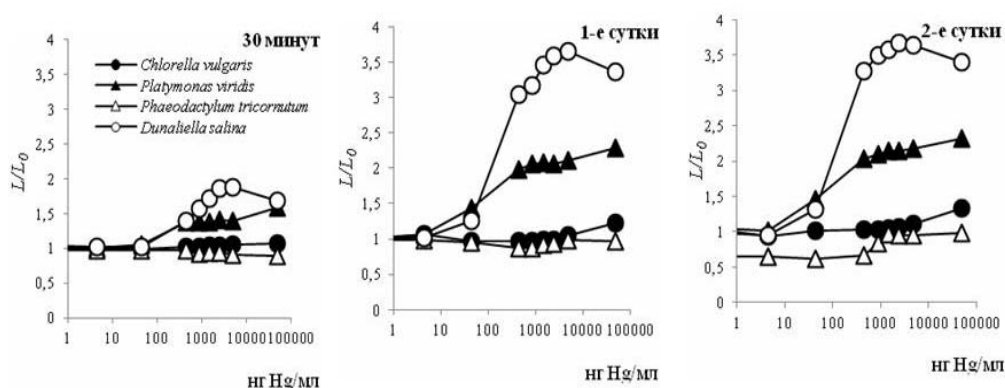


**Рис. 3.** Зависимость численности ( $N$ ) клеток в культурах водорослей от концентрации ртути в питательной среде.  $N_0$  – контроль

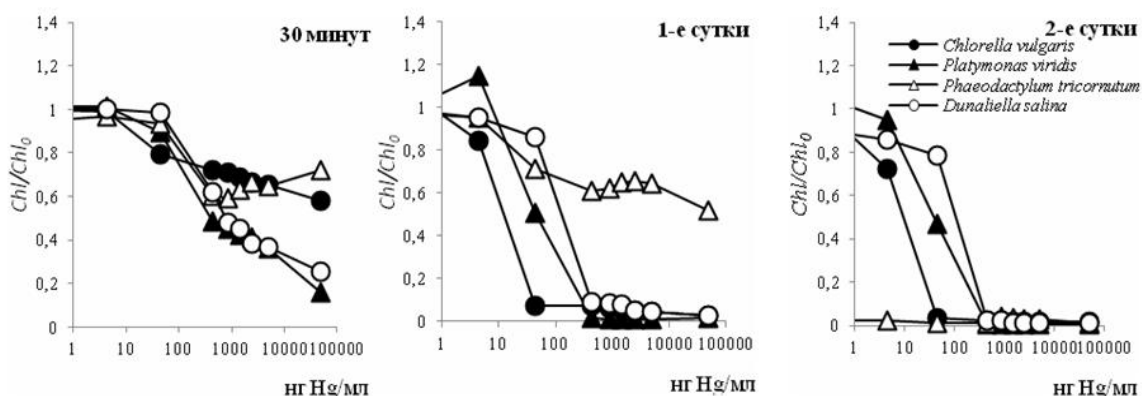
Наиболее существенные изменения касались таких показателей как размеры клеток и интенсивность флуоресценции хлорофилла. Эти изменения наблюдались нами уже через 30 мин. и усиливались в течение 1-2 суток. Так размеры клеток в культурах крупноразмерных водорослей (*Dunaliella salina* Teod., и *Platymonas viridis* Rouch), в результате стресса, при концентрации ртути

439.6 нг Hg·мл<sup>-1</sup>, увеличивались в 2-4 раза. Для мелких водорослей (*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. и *Chlorella vulgaris* Beijer.) повышение было не столь значительно или вообще не наблюдалось. Согласно литературным данным [3], клетки *Phaeodactylum tricornutum* при воздействии тяжелых металлов часто лишались концевых выростов и в популяции начинали преобладать мелкие клетки, что было обнаружено и в наших экспериментах.

Одновременно с увеличением размеров клеток происходила перестройка в их пигментном составе при увеличении концентрации ртути примерно с 40 нг Hg·мл<sup>-1</sup> – интенсивность флуоресценции хлорофилла снижалась, более чем на порядок, вплоть до полного его разрушения. Наименьшие изменения через сутки произошли в культуре *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin., однако на вторые сутки эксперимента интенсивность флуоресценции пигмента для всех клеток в этой культуре практически равнялась нулю. Интересно отметить, что концентрации металлов, лишь незначительно снижающие численность водорослей, вызывали заметное падение содержания пигментов. Известно, что токсическое действие тяжелых металлов проявлялось в снижении уровня фотосинтетических пигментов в клетках водорослей, особенно хлорофилла «а» и увеличении его неактивной формы - феофитина [3].



**Рис. 4.** Зависимость размеров ( $L$ ) клеток в культурах водорослей от концентрации ртути в питательной среде.  $L_0$  – контроль



**Рис. 5.** Зависимость интенсивности флуоресценции хлорофилла ( $Chl$ ) в культурах водорослей от концентрации ртути в питательной среде.  $Chl_0$  – контроль

Возможность одновременного использования проточной цитометрии и микроскопии позволило нам более детально исследовать изменения, происходящие в популяции клеток в культуре. Так как наиболее устойчивой к воздействию ртути оказалась *Dunaliella salina* Teod., более детальные исследования были проведены на культуре этой водоросли.

Нами показано резкое снижение (почти на порядок) флуоресценции хлорофилла в расчете на клетку, начиная с концентрации ртути 439.56 нг Hg·мл<sup>-1</sup>. На цитограммах, полученных в пробах с соответствующей концентрацией ртути, по оси ординат четко прослеживается расслоение

кластера. Необходимо отметить, что такой низкий уровень флуоресценции обычно типичен для мертвых клеток. По оси абсцисс, в пробах с теми же концентрациями ртути, мы наблюдали увеличение размеров клеток в среднем в 2.5 раза (рис. 6).

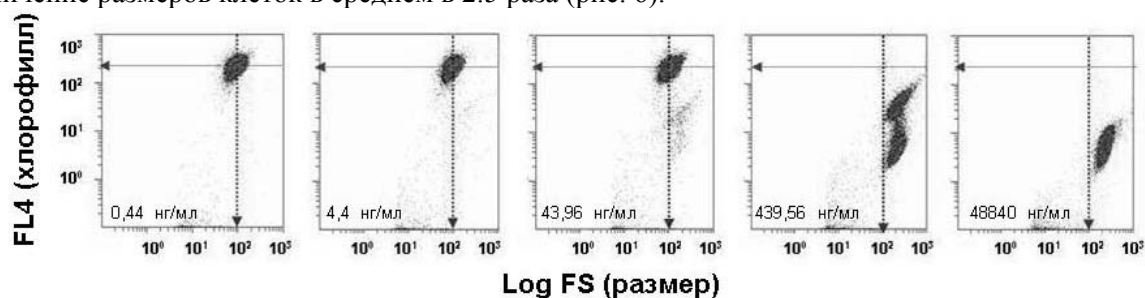


Рис. 6. Результаты цитометрии при воздействии ртути на культуру *Dunaliella salina* Teod.

Для детализации морфологических изменений клеток водорослей эти же пробы были исследованы микроскопически. При концентрации токсиканта 439.56 нг  $\text{Hg} \cdot \text{мл}^{-1}$  в пробах появлялись максимально крупные клетки, а начиная с концентрации 48840 нг  $\text{Hg} \cdot \text{мл}^{-1}$ , практически все водоросли были мертвы, имели разрушенную клеточную стенку или сильно уплотненную оболочку, хотя размеры их были несколько меньше (рис. 7).

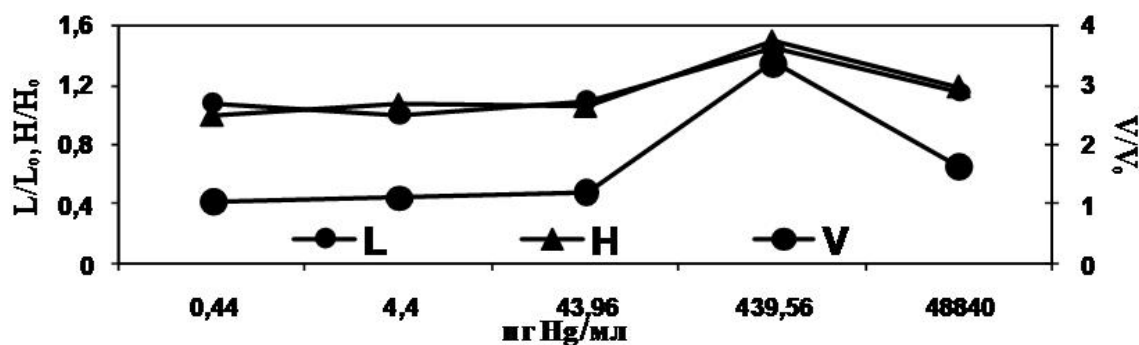


Рис. 7. Изменение линейных размеров (D – длина, Н – ширина) и объема (V) клеток *Dunaliella salina* после суточной экспозиции в зависимости от концентрации ртути в среде.

Известно, что реакции одноклеточных водорослей на добавки тяжелых металлов могут быть связаны с нарушением проницаемости клеточной оболочки, о чем свидетельствует выход из клеток калия [3]. Это приводит к изменению внутриклеточного ионного баланса и нередко сопровождается морфологическими аномалиями, в частности – появлением в культуре крупных округлых или удлинённых клеток с толстой клеточной оболочкой, что приводит к существенному возрастанию размерной гетерогенности популяции в целом [1, 3]. Вероятно, при этом происходит нарушение митотического цикла и ионного баланса клеток, усиливается внутриклеточное осмотическое давление, что и приводит к увеличению относительного размера клеток. При концентрации более 400 нг  $\text{Hg} \cdot \text{мл}^{-1}$  наступает «интерфазная гибель» клеток, и постепенно происходит их полное разрушение.

Полученные данные могут быть использованы при разработке критериев токсикологического нормирования антропогенной нагрузки на морские экосистемы.

#### Список литературы

1. Гулин С.Б. Действие ионизирующего излучения и ртути на одноклеточные водоросли: радиационно-экотоксикологическое исследование // Морск. Экол. журн. - 2013. - Т. 7. - № 3, - С.31-38.
2. Филенко О.Ф. Водная токсикология. М.: Изд-во МГУ, 1988. 154 с.
3. Капков В. И. Водоросли как биомаркеры загрязнения тяжелыми металлами морских прибрежных экосистем: автореф. дисс. докт. биол. наук. – М., 2003. – 42.